

18/5/5  
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009832032

WPI Acc No: 1994-111888/199414

Related WPI Acc No: 1992-351464

XRAM Acc No: C94-051516

XRPX Acc No: N94-087601

Expression of human protein disulphide isomerase gene - used to prepare polypeptide in high yield

Patent Assignee: TONEN CORP (TOFU )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6038771	A	19940215	JP 91114074	A	19910418	199414 B

Priority Applications (No Type Date): JP 90295017 A 19901031

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6038771	A		30	C12N-015/61	

Abstract (Basic): JP 6038771 A

A linked gene for the expression of human protein disulphide isomerase (hPDI) consists of a DNA coding human serum albumin prepro-sequence and hPDI gene.

A replicable expression vector which can express the above linked gene in a host, a transformant prep. by transforming a host by the above expression vector, the prepn. of a recombinant hPDI in which the above linked gene is expressed in the above transformant, a recombinant hPDI prep. by the above method, a transformant contg. the linked gene and an exotic gene coding a polypeptide controlling the production are also claimed.

The prepn. of a polypeptide uses the hPDI gene and the exotic gene coding the polypeptide aiming the production are co-expressed in the above transformant, and the polypeptide is recovered.

Dwg.0/8

Title Terms: EXPRESS; HUMAN; PROTEIN; DI; SULPHIDE; ISOMERASE; GENE; PREPARATION; POLYPEPTIDE; HIGH; YIELD

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12N-015/61

International Patent Class (Additional): C07K-003/20; C12N-001/19;

C12N-009/90

File Segment: CPI; EPI

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-38771

(43)公開日 平成6年(1994)2月15日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/61	Z N A			
C 0 7 K 3/20		8517-4H		
C 1 2 N 1/19		7238-4B		
9/90		9161-4B		
		8931-4B		
		C 1 2 N 15/00	Z N A A	
審査請求 未請求 請求項の数15(全 30 頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願平3-114074		(71)出願人	390022998 東燃株式会社 東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号
(22)出願日	平成3年(1991)4月18日		(72)発明者	早野 俊哉 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内
(31)優先権主張番号	特願平2-295017		(72)発明者	加藤 世都子 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内
(32)優先日	平2(1990)10月31日		(72)発明者	高橋 信弘 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内
(33)優先権主張国	日本 (J P)		(74)代理人	弁理士 久保田 耕平 (外3名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子の発現方法および該遺伝子との共発現によるポリペプチドの製造方法

## (57)【要約】

【目的】 プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 遺伝子の発現、及び該遺伝子と有用ポリペプチドをコードする外来遺伝子との共発現を提供する。

【構成】 この発明は、ヒト血清アルブミンプロプレコ配列をコードするDNAとヒトPDI遺伝子とから成る新規の連結遺伝子を発現ベクターに組み込み、宿主細胞を形質転換させ、発現させることによるPDIの製造方法、並びに、共発現可能な該連結遺伝子と有用ポリペプチドをコードする外来遺伝子とを含む形質転換体を共発現させることによる該ポリペプチドの製造方法と特徴とする。

【効果】 ヒトPDIの大量生産法が確立され、及び同一細胞内でのヒトPDI遺伝子との共発現により有用ポリペプチドの生産効率の向上が可能となった。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼ発現用の、ヒト血清アルブミンプレプロ配列をコードするDNAとヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子とからなる連結遺伝子。

【請求項2】 配列番号2に示される-24番目～491番目のアミノ酸配列をコードする塩基配列から成る、ヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼ発現用の、ヒト血清アルブミンプレプロ配列をコードするDNAとヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子とからなる連結遺伝子。

【請求項3】 前記塩基配列が配列番号2に示される1番目～1545番目の配列から成ることを特徴とする請求項2記載の連結遺伝子。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか一項に記載の連結遺伝子を宿主内で発現させ得る複製可能な発現ベクター。

【請求項5】 請求項4記載の発現ベクターで宿主を形質転換して得られる形質転換体。

【請求項6】 宿主が酵母である請求項5記載の形質転換体。

【請求項7】 請求項1～3のいずれか一項に記載の連結遺伝子を請求項5又は6記載の形質転換体内で発現させることを特徴とする組換えヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼの製造方法。

【請求項8】 請求項1～3のいずれか一項に記載の連結遺伝子を宿主内で発現させ得る複製可能な発現ベクターを構築し、

宿主を前記発現ベクターで形質転換して形質転換体を得、

前記連結遺伝子を発現させ得る条件下で、前記形質転換体を培養して組換えヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼを分泌させ、

前記組換えヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼを回収する、ことを特徴とする請求項7記載の方法。

【請求項9】 分泌された前記組換えヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼを、疎水性カラムクロマトグラフィーによって分離回収することを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項10】 請求項7～9のいずれか一項に記載の方法によって得られる、配列番号3に示される1番目～491番目のアミノ酸配列から成る組換えヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼ。

【請求項11】 共発現可能な請求項1～3のいずれか一項に記載の連結遺伝子と生産を目的とするポリペプチドをコードする外来遺伝子とを含む形質転換体。

【請求項12】 形質転換体が形質転換酵母である請求項11記載の形質転換体。

【請求項13】 外来遺伝子がヒト血清アルブミンをコードする遺伝子である請求項11記載の形質転換体。

【請求項14】 請求項11～13のいずれか一項に記載の形質転換体内で、ヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子と生産を目的とするポリペプチドをコードする外来遺伝子とを共発現させて該ポリペプチドを生産させ、及び該ポリペプチドを回収することを特徴とするポリペプチドの製造方法。

【請求項15】 ポリペプチドがヒト血清アルブミンである請求項14記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ポリペプチド中のジスルフィド結合の交換反応を触媒することによりポリペプチドの高次構造形成を促進する酵素プロテインジスルフィドイソメラーゼをコードする遺伝子の発現に関する。さらに本発明は、該遺伝子と有用ポリペプチドをコードする外来遺伝子との共発現に関する。

【0002】

【従来の技術】*in vitro*での変性蛋白質の再構成(Refolding)実験の結果より、ポリペプチドのフォールディング速度を律速する反応として、ジスルフィド結合の異性化とプロリンペプチドの異性化反応があることが知られ(Freedman, Cell 57, 1069-1072, 1989; Fisher & Schmid, Biochemistry 29, 2205-2212, 1990)、フォールディング反応におけるこれらの遅い反応を触媒する酵素として、後者には、ペプチジルプロリンシトランスイソメラーゼ(PPI)が、前者にはプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)とチオレドキシナーゼが見い出されている。*in vitro*の実験では、これらの酵素が、変性蛋白質の再構成の速度を促進することが示され、遺伝子工学的に生産された不活性蛋白質の*in vitro*での再構成への利用が考えられている(Schein, Bio/Technology 7, 1141-1148, 1989; 高橋重三、日本農芸化学会誌 64, 1035-1038, 1990)。

【0003】PDIは、可溶性で、哺乳類の肝臓から比較的容易に単離され、その触媒としての性質が詳細に調べられている。PDIは、チオール/ジスルフィド結合の交換反応を触媒し、蛋白質基質のジスルフィド結合の形成・異性化・あるいは還元を行うことができる(Freedman, Cell 57, 1069-1072, 1989)。PDIは*in vitro*ではRNaseなどの単一ドメインからなる蛋白質や、血清アルブミンなどの多量ドメインからなる蛋白質などの分子内でのジスルフィド結合の形成や交換反応を促進したり、又は免疫グロブリンやプロコラーゲンなどのようなサブユニット構造を持つ蛋白質の分子間でのジスルフィド結合の形成などの反応を促進することが知られている(Freedman, Nature 329, 196, 1987)。

【0004】哺乳類由来のPDIは、通常分子量約5万7千からなるポリペプチドの水モダマーとして存在し、きわめて酸性度の高いpI値(pI 4.2～4.3)を持っている。

【0005】ラットの肝臓由来のPDIについて、その遺伝子が単離され、その遺伝子の塩基配列よりPDIのアミノ酸配列が推定され、PDIが2種類の相同性単位からなる分子内重複構造を持つことが示されている。2種類の相同性単位のうち一種については、チオレドキシンのアミノ酸配列と相同性があることが見い出され、類似の活性部位アミノ酸配列を持つと考えられている (Edman et al., *Nature* **317**, 267-270, 1985)。チオレドキシンは、*in vivo* でインシュリンのジスルフィド結合を還元したり、RNase のジスルフィド結合の交換反応を促進することができ、*in vivo* で蛋白質のフォールディング過程でPDIと同様の働きをすることが示唆されている (Pigiet & Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7643-7647, 1986)。

【0006】PDIの生体内での存在量は、組織の種類や細胞の分化段階の違いによって異なるが、このことと、分泌するある特定の蛋白質の存在との間に相関性があること、そして、蛋白質の分泌の際に通過することが知られている小胞体内部にPDIが豊富に局在化していることなどから、細胞内においてもPDIが、新しく合成される分泌蛋白質のジスルフィド結合の形成に関与していると推定されている。このことは、無細胞蛋白質合成系を用い、モデル系としてアグリジンジンの生合成を行い、この時、PDIを洗い流した小胞体分画だけではアグリジンジンの翻訳に共役したジスルフィド結合の形成はほとんど起らないが、PDIを加えると、ジスルフィド結合の形成能が回復するという結果によって支持されている (Bulleid & Freedman, *Nature*, **335** 649-651, 1988)。

【0007】PDIについては、ジスルフィド結合の形成への関与以外に、蛋白質の翻訳後の他の修飾反応にも関わっている証拠が得られている。例えば、PDIは、プロコラーゲンのプロリン残基を水酸化するプロリラー4-ハイドロキシラーゼの触媒ユニットであるβサブユニットや、合成蛋白質のN-グリコシル化の過程で、糖鎖を付加されるペプチドのシグナル配列 Asn-X-Ser/Thr を認識するグリコシル化部位結合蛋白質 (Pihlajaniemi et al., *EMBO J.* **5**, 643-649 1987; Geetha-Habib et al., *Cell* **54**, 1053-1060 1988)、さらにまた、甲状腺ホルモン結合蛋白質 (trifoliod-L-thyronine binding protein) (Cheng et al., *J. Biol. Chem.* **262**, 11221-11227, 1987) などとの同一性が示され、PDI分子の蛋白質の修飾反応における多機能性が示唆されている。これらの事実に加え、PDI分子とは異なる分子種であるが、アミノ酸配列上において相同性がある分子種も見い出されている。それらの例としてはPDIの活性部位と考えられているアミノ酸配列と相同性がある配列を持ち、ジスルフィド結合の異性化を触媒することが見い出されたフォトリトピン (Polilitropin) やルトロピン (Lu tropin) などの性腺刺激ホルモンや (Boniface & Reich

et al., *Science* **247**, 61-64, 1990)、ホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェイトを1,2-ジアシルグリセロールとイノシトール1,4,5-トリホスフェイトに加水分解する酵素でありその内にPDIと相同性を持つ領域が存在するホスホリパーゼCなども知られる (BenNETT et al., *Nature* **334**, 268-270, 1988)、PDIやPDI様分子の細胞内外でのきわめて広範な生命現象への関りが考えられている。

【0008】以上のように広範な働きが示唆されているが、PDIの主な効果は分子内及び分子間のジスルフィド結合の異性化を触媒し、天然の高次構造を持った蛋白質 (及び集合体) を生じさせることと考えられている。しかししばしば、ほとんど化学量論的な量のPDIが最適な反応速度を実現するために必要とされる。従って、ジスルフィドイソメラーゼ活性が低い場合には、蛋白質分子内及び分子間でのジスルフィド異性化速度が低く、従って適切なジスルフィド結合を有する蛋白質の形成の効率が低いことが予想される。種々の真核生物由来の蛋白質 (特に分泌蛋白質類) が、大腸菌内で不溶性分子集合体を形成する原因の1つがこのジスルフィドイソメラーゼ活性の低さにあると考えられることも可能である。大腸菌では、ジスルフィドイソメラーゼとしてチオレドキシンを含むが、チオレドキシンはジスルフィド還元酵素としてはPDIよりも強力であるが、イソメラーゼとしての効率はよくない。一方、分子内ジスルフィド結合は、分泌蛋白質に高頻度にもみられることから、分泌能の高い細胞あるいは組織においてジスルフィド異性化を介したジスルフィド結合活性が高いことが予想されるが、実際にラットの種々の組織の相対的なPDI mRNA含量の比較 (肝臓>脾臓、腎臓>肺>精巣、脾臓>心臓>脳) からこのことが強く示唆されている (Edman, *Nature* **314**, 267-270, 1985)。

【0009】また、還元された状態の環境が蛋白質合成の場合として考えられた場合には、適切なフォールディングのために必要とされるジスルフィド結合の形成は阻害されるであろう。このような環境は、例えば、コンパートメントがないような原核生物の細胞内で生じる。このような点を考えて、原核生物細胞と真核生物細胞では、ジスルフィド結合形成に関わる因子とそれを可能にさせる環境が異なるのかも知れない。組換えDNA技術を用いて、有用な蛋白質 (その多くは分泌性の蛋白質である) を産生させようとするとき、その蛋白質に適した条件下でジスルフィド結合の形成をおこなわせる必要がある。そのためには、宿主細胞内の環境 (適切なコンパートメント) が実現しなければならないであろうし、その環境 (コンパートメント) に親和性の高いジスルフィド形成 (ジスルフィド異性化) 酵素が多量に存在しなくてはならないであろう。

【0010】これら二つの点は組換えDNA技術を用いて、ジスルフィド結合を有する蛋白質を効率よく産生

5

せる際に最も注意しなければならない点と考えられる。

【0011】しかしながら、いまだに *in vivo* の系でプロテインジスルフィドイソメラーゼを適切なコンパートメントで多量にそして、目的とする有用蛋白質と共存させつつそれに備わせる系は存在していない。

【0012】

【発明が解決しようとする問題点】 *in vitro* での変性蛋白質の再構成への利用又は、細胞内での分泌蛋白質の産生率向上への利用等が考えられているにもかかわらず、該酵素の入手は臓器からの直接的精製に限られていた。各種細胞での他種由来の PDI の発現はいまだなされておらず、遺伝工学的に産生する手段、他の有用ポリペプチドの遺伝子と共設させることによってその産生効率を挙げる手段等は確立していなかった。

【0013】本発明は、ヒト PDI 発現用のヒト血清アルブミンプレプロ配列をコードする DNA とヒト PDI 遺伝子とから成る連結遺伝子を宿主内で発現させ得る発現ベクター、該ベクターで宿主が形質転換された形質転換体内で該連結遺伝子を発現させることによる組織内ヒト PDI の製造方法及び組織内 PDI を提供することを目的とする。

【0014】さらにまた、本発明は、共発現可能な該連結遺伝子と生産を目的とするポリペプチドをコードする外来遺伝子とを含む形質転換体、及び該形質転換体内でヒト PDI と及び該外来遺伝子を共発現させることによる該ポリペプチドの製造方法を提供することを目的とする。

【0015】

【問題点を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究した結果、ヒト血清アルブミンプレプロ配列をコードする DNA とヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子とを連結した遺伝子を作製し、これを組み込んだ発現用ベクターを見出したことにより本発明を完成させた。

【0016】以下に本発明の詳細を説明する。

【0017】ヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼ (protein disulphide isomerase; 「PDI」) と略称する) cDNA をコードするクローンは、ヒト肝臓 cDNA ライブラリー及びヒト胎盤 cDNA ライブラリー (Clontech 社) から次のようにして分離される。

【0018】ヒト肝臓及びヒト胎盤 cDNA ライブラリーを大腸菌にファージ感染させ、増殖させ、ファージ DNA をフィルターに固定する。一方、ヒトプロリン 4-水酸化酵素 (PDI と同一タンパク質) cDNA [Pihlajanemi, T. ら (1987) EMBO J. 6, 643] の 243 番目から 282 番目の塩基配列の相補鎖に対応する 40 mer の合成オリゴマー DNA をプローブとするハイブリダイゼーションにより陽性クローンをスクリーニングし、そのファージ DNA を EcoRI 消化し、得られた約 150 bp の

6

インサート DNA を PDI cDNA スクリーニング用プローブとする。このプローブを用いて、フィルターに固定された上記ファージ DNA をスクリーニングして、陽性クローンを分離する。

【0019】このようにして得られた複数の陽性クローンを EcoRI 消化して EcoRI インサート DNA 断片を得て、各クローンのインサートについて制限酵素地図を作成し、Pihlajanemi による制限酵素地図と比較した結果、肝臓由来のクローン (pEPDI16) と胎盤由来のクローン (pEPDI4) とでヒト PDI cDNA の全長をカバーしていることが推測された。

【0020】両クローンの DNA 塩基配列を決定した結果、これらのクローンが配列番号 1 に示される全長 2454 塩基対から成るヒト PDI cDNA をコードしていることが判明した。また、その塩基配列から推定されたアミノ酸配列は配列番号 1 に示すとおりであった。配列中、成熟タンパク質は Asp<sup>1</sup> から Leu<sup>411</sup> の 491 個のアミノ酸から構成されていると考えられ、Asp<sup>1</sup> に先行する 17 個のアミノ酸から成るペプチドはシグナルペプチドを表わしていると考えられる。

【0021】本発明は、PDI を発現・産生させるための、ヒト血清アルブミン遺伝子プレプロ配列をコードする DNA と前記ヒト PDI 遺伝子とから成る連結遺伝子を提供する。

【0022】該連結遺伝子は、例えば第 1 図 C に示すように、通常 PDI 遺伝子の上流に該プレプロ配列をコードする DNA を配置させることによって作製される。但し、ヒト PDI を適切なコンパートメント (小細胞と考えられている) に輸送するためのリーダー配列としてはヒト血清アルブミンのプレプロ配列に限定する必要はなく、他のシグナル配列やプレプロ配列であってもよい。

【0023】具体的には、前記クローン pEPDI16 及び pEPDI4 DNA を、夫々 EcoRI/PstI、PstI/BamHI で消化し、約 490bp 及び約 1.3kb の DNA 断片を得、両断片を EcoRI/BamHI 消化プラスミドベクター pUC119 に連結し (pHPDIEB)、Kunkel 法 [Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488] により cDNA 上の PDI シグナル配列と PDI 本体との境界部分に制限酵素 NaeI 切断部位を導入し (pHPDINae)、NaeI/Hind III 消化により PDI シグナル配列を含まない約 1.7kb の PDI DNA 断片を得る。

【0024】

一方、pUC119 を EcoRI 消化し、これに XhoI リンカー: 5'-AATTCCTGAG GAGCTCTTAA-5' を連結し、XhoI/BamHI 消化し、これにヒト血清アルブミン (以下「HSA」) と略称する) プレプロ配列を連結し (pUC 119 Sig)、StuI/Hind III 消化し 3.2kb の DNA 断片を得る (HSA プレプロ配列の合成法は後述の実施

7

例に示される)。

【0025】pbPD1Nae由来の1.7kb DNA 断片とpUC 119 Sig 由来の3.2kb DNA 断片を連結し(pbPD1Ly1)、EcoRI 消化、XbaI 断片による平滑化、BamHI 消化を順次行つてHSA プレプロ配列下流にヒトPD I 本体を接続した(第2図)、リーダー配列変型型の連結遺伝子を得ることができる。

【0026】本発明の連結遺伝子の作製方法及びその構成遺伝子間の配置は、上述の方法に限定されるものではなく、PD I を発現させる能力を有するものは全て含まれる。また、該連結遺伝子の類似体は本発明の範囲外であるが、ヒト以外の他の動物由来の対応遺伝子から容易に作製されることは明である。

【0027】本発明はまた、配列番号2に示される-24番目~+491番目のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる該連結遺伝子を提供する。この場合、この塩基配列と実質的に同様の作用を示す遺伝子、例えば遺伝子コードの縮重に基づく該塩基配列の誘導体は全て本発明に含まれる。例えば、本発明の実施態様により、本発明は配列番号2に示される全塩基配列からなる該連結遺伝子を提供する。

【0028】本発明はさらに、本発明の連結遺伝子を宿主内で発現させる複製可能な発現ベクターを提供する。

【0029】本発明の連結遺伝子を組み込むためのベクターは、宿主内で発現可能であり且つ複製能力を有するものである。一般的には、宿主細胞と適合し得る種から誘導されたレプリコン及び制御配列を含むベクターが、宿主と関連して使用される。ベクターは、通常、形質転換された細胞中での表現型選択を可能にするマーカー配列と複製部位とを保有している。

【0030】本発明の発現ベクターを構築するためのベクターとしては、例えば本出願人による特開平2-117384号公報に開示のプラスミド pIDB-ADG-HSA-A (第1図-C参照) が使用される。このプラスミドはHSA cDNAを含み、また酵母アルコールデヒドロゲナーゼI (ADH I) プロモーター、ADH4ターミネーター、アンピシリン耐性遺伝子(Amp<sup>r</sup>)、及びLeu2遺伝子を含んでいる。そのため、このプラスミドを、XhoI消化し、XbaI断片により平滑し、BamHI 消化してHSA cDNAを除去する。得られた約8kb DNA 断片の5' 端を脱リン酸化した後、前述の本発明の連結遺伝子を連結することにより、発現プラスミド(pADH-PD1Ly1)を得ることができる。もちろん、本発明の連結遺伝子を発現させる同等の機能を果すことができる別の種類のベクターを使用することもできる。

【0031】本発明はさらに、本発明の発現ベクターで宿主を形質転換して得られる形質転換体を提供する。

【0032】宿主としては、大腸菌、枯草菌などの原核細胞、及び酵母が挙げられ、特にプロセッシングを介して成熟型PD I を分泌し得る宿主が好ましい。好適な宿主は酵母である。宿主酵母としては、*Saccharomyces* 属

8

*reissiae*等が挙げられ、本発明の形質転換体の作製にあたっては特に酵母AH22株が好適に使用される。本発明の範囲外であるが、酵母以外の真核細胞(例えば、動物細胞)も宿主として使用し得ることは明である。宿主細胞への発現ベクターの移入は慣用的方法で実施され、例えば、塩化カルシウム処理法、プロトプラスト(又はスフェロプラスト)一ポリエチレングリコール法、電気穿孔法などにより容易に実施し得る。目的の形質転換体は、発現ベクターがpADH-PD1Ly1の場合、得られた菌体をSD(-Leu)プレート上で培養することによってスクリーニングし、取得される。

【0033】従って、本発明はまた、上述のようにして作製した形質転換体内で本発明の連結遺伝子を発現させることによる組換えヒトPD I の製造方法を提供する。本発明の実施態様によれば、本発明の製造方法は以下に示す段階を含む。

【0034】即ち、本発明の連結遺伝子を宿主内で発現させる複製可能な発現ベクターを構築する段階と、宿主を前記発現ベクターで形質転換して形質転換体を得る段階と、前記連結遺伝子を発現させる条件下で、前記形質転換体を培養して組換えヒトPD I を分泌させる段階と、前記組換えPD I を回収する段階と、を含む。

【0035】宿主として酵母を用いる場合には、ヒトPD I 前駆体タンパク質がプロセッシングを受けて、組換えヒトPD I が遺伝子産物として分泌される。もし宿主として酵母以外の例えば大腸菌、枯草菌等の微生物が用いられる場合には、プロセッシングを受けていないヒトPD I 前駆体タンパク質が得られるであらう。

【0036】遠心分離により細胞と培養培地とを分離し、必要に応じて細胞を破砕し、次に例えば限外濾過により濃縮した濃縮液を疎水性カラムクロマトグラフィーに掛けることにより組換えヒトPD I を容易に精製分離することができる。このクロマトグラフィーに使用し得る疎水性カラムは特定のものに限定されるものではないが、例えばTSK-gel Phenyl-5PW疎水性カラム(東ソー製)が使用され得る。この場合組換えヒトPD I はKC I 含有ホウ酸緩衝液(pH 8.0)中0.85Mから0M硫酸アンモニウムへの直線的濃度勾配により溶出され得る(第4図)。SDS電気泳動分析(第5図)から組換えヒトPD I は、約55kDa の分子量を有し、またスクランブルドリボスクレアゼAの再構成の程度を指標として定量することにより、得られた組換えヒトPD I はPD I 活性をもつことも確認された(後述の実施例参照)。

【0037】本発明方法によって產生される組換えヒトPD I は、天然型のヒトPD I と比較してN末端アミノ酸がAspからGlyに改変されたものであった。従って、本発明は491個のアミノ酸からなる配列番号3に示されるGly<sup>1</sup> Leu<sup>911</sup>のアミノ酸配列から構成される組換えヒトPD I をも提供する。

【0038】本発明はさらに、共発現可能な、ヒトPD

9

I 遺伝子とヒト血清アルブミンプロモーターをコードするDNAとから成る連結遺伝子と、生産を目的とするポリペプチドをコードする外来遺伝子を含む形質転換体を提供する。

【0039】形質転換体中の該連結遺伝子と該外来遺伝子は、互いに共発現可能な状態であれば、同一ゲノム上にあってもよく、又は異なるゲノム上にあってもよい。宿主細胞の形質転換は、例えば、該連結遺伝子及び該外来遺伝子を同一の又は異なるベクター内に組み込み、得られたベクターを塩化カルシウム処理法、プロトプラス

ト(又はスフェロプラスト)ーポリエチレングリコール法、電気穿孔法などの慣用的方法で宿主内に移入することによって実施される。

【0040】該外来遺伝子によってコードされるポリペプチドは、増幅発現されたPDIの触媒作用(即ちポリペプチド中のジスルフィド結合の形成、交換反応等を促進する)が直接的に発揮されるために、その構造中にジスルフィド結合を含むものであれば如何なる種類のポリペプチドであってもよい。さらに、本発明は、増幅発現されたPDI活性の効果が遺伝子発現、ポリペプチドの

フォールディング、輸送等に関与する蛋白質に対して発揮され、それにより間接的に生産性が增大するような場合にも適用される。本発明の実施態様により、本発明はまた該外来遺伝子としてヒト血清アルブミン(HSA)をコードする遺伝子を提供する。

【0041】本明細書中、「ポリペプチド」なる用語は、短鎖及び長鎖ペプチド並びに蛋白質を含むことを意味する。

【0042】また宿主としては、大腸菌、枯草菌などの原核細胞、酵母、動物細胞などの真核細胞が挙げられる。特に、翻訳後修飾やプロセッシングを介して成熟ポリペプチドを分泌し得る宿主、例えば真核細胞が好ましく、特に酵母が好ましい。

【0043】本発明はさらに、上記形質転換体内で、ヒトPDI遺伝子と他のポリペプチドをコードする外来遺伝子とを共発現させて該ポリペプチドを生産させ、及び該ポリペプチドを回収することから成るポリペプチドの製造方法を提供する。

【0044】本発明の実施態様により、ヒトPDI発現プラスミドを用いてHSA生産酵母を形質転換して得られた酵母内でHSA及びPDIを任意の培地中で共発現させた場合には、単独に発現させた場合と比べて、HSAの分泌量は平均で約60%増加した(第8図)。

【0045】理論に拘束されるつもりはないが、共発現によるHSA分泌量の増加に関しては以下のように考えられる。

【0046】HSAは、17個のジスルフィド結合を持つ蛋白質であり、かつ、*in vitro*での変性蛋白質からの再構成実験において化学量論量のPDIの存在により、その高次構造形成が促進されることが知られてい

る。

【0047】酵母HIS23株によって、HSAは可溶性分子として分泌されるが、同固体の細胞内にもHSA分子が検出されている。SDS電気泳動法により、細胞内のHSAを分析すると、還元剤存在下ではゲル上で単一バンドとして正常なHSA分子と同一の挙動を示すのに対し、還元剤非存在下では、より分子量の大きい不連続なバンド群として検出され、明らかに正常なHSAとは異なる挙動を示す。これらの結果は、細胞内に存在するHSA分子は、分子内ジスルフィド結合が不完全に形成されているため生じると推定される。一方、PDIを共発現させた細胞では、細胞内のHSAの還元剤非存在下でのSDS電気泳動では、HSA分子は外来のPDI cDNAを共発現させていない酵母菌から得た細胞内HSA試料と比較してよりまとまったバンドとして検出されることから、PDIはHSA分子内の正常なジスルフィド結合の形成を促進し、より効率的にHSA分子の高次構造形成を補助していると推定される。このことによって、例えば、不安定な構造を持つHSAの細胞内での会合や、プロテアーゼによる分解がより少なくなるために分泌量が増加していると思われる。

【0048】また、PDIを共発現させた場合とさせない場合でのHIS23株細胞内のHSAのmRNA存在量をNorthernブロット法により比較すると、PDI遺伝子を発現させた場合にはHSAのmRNA量が増加している。このことは、PDIが直接HSA分子に作用している可能性だけでなく、HSA遺伝子の転写レベルにも影響を与えている可能性をも示唆している。しかし、小胞体への膜移行過程を介する細胞内輸送に働くヒト血清アルブミンのリーダー配列の融合によってヒトPDIが多量に酵母菌から分泌されたこととHSAの分泌量が増加したことが相関していることから、PDIは、小胞体においてHSAと共存し、直接HSAに作用したことがHSAの産生レベルを上昇させた主要原因であると考えたほうがより単純であるようにみえる。さらに、HIS23株より分泌されたHSAとPDIの量をみると、PDIはHSAの数倍分泌されており、さらに細胞内に検出されるヒトPDIレベルも高いことから、変性HSAの*in vitro*での再構成において促進効果を示すのに必要とされるPDI量が十分に該酵母菌小胞体内でも確保されているものと推定される。このこともまた、PDIがHSAに直接作用していることを支持しているようにみえる。

【0049】このように、HSAの例でPDIの共発現によってその分泌量の増加効果が得られ、その効果がPDIが直接HSAの高次構造形成に働いている可能性が高いことから、より一般的に、ジスルフィド結合の形成が、高次構造の形成や安定化に寄与している分泌蛋白質全般についても同一細胞内でPDIを高度に増幅発現させることにより同様の分泌量の増加効果が期待できると

11

考えられる。

【0050】以下の実施例により、さらに本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0051】

【実施例I】

# ヒトPDI (protein disulphide isomerase) cDNAのクローニング

ヒト肝臓g11cDNAライブラリー (Clontech社) 約100,000 クローン を 0.2% のマルトースを含むLB培地 (1% バクトトリプトン、1% NaCl および 0.5% イーストエキストラクト) で 37°C 一晚培養した大腸菌 Y1090 株培養液 500  $\mu$ l と混合し、これに 1M MgCl<sub>2</sub> 5  $\mu$ l を加え 37°C で 10 分間加熱することによりファージを大腸菌に感染させた。これを 50ml の LB 上層寒地培地 (LB 培地、10mM MgCl<sub>2</sub> および 0.7% アガロース) に加え混合後、23cm  $\times$  23cm プレート中の LB 寒地培地上にまいた。上層寒地培地を固めた後、37°C で一晚培養しファージを増殖させた。得られたファージをフィルター (Hybond-N, Amersham 社) に移し、アルカリ溶液 (0.5N NaOH および 0.15M NaCl) に浸した 3MM 濾紙 (Whatman 社) 上に、ファージの付着面を上に向けて 1 分間置き、続いて中和溶液 (1M Tris-HCl (pH 7.5) および 1.5M NaCl) に浸した同濾紙上に 1 分間置いた。さらにフィルターを 2 $\times$ SSC 溶液 (20 $\times$ SSC = 3M NaCl および 0.3M クエン酸三ナトリウム) で洗浄、風乾後、UV 照射を 2 分間行うことによりファージDNA をフィルターに固定した。こうして得られたフィルターを用いて以下の手順に従ってヒトPDI cDNA のスクリーニングを行った。

【0052】プローブには、ヒトプロリン 4-水酸化酵素 (PDI) と同一タンパク質 cDNA [Pibla] anenil, T. et al. (1987) EMBO J., 6, 643 ] の 243 番目から 282 番目の塩基配列の相補鎖に対応する 40mer のオリゴマー DNA (5' -TGCGCTCCACCTTGGCCAACTGATCTCGGAACCTTCTGC-3') を、自動DNA合成機 (Applied Biosystems 社モデル 380B) により合成したものをを用いた。

【0053】合成DNA (20pmoles) を 50mM Tris-HCl (pH 7.5); 10mM MgCl<sub>2</sub>; 5mM ジチオスレイトール、10  $\mu$ l Cl<sup>-</sup> [γ-<sup>32</sup>P] ATP (≈3000Ci/ $\mu$ mol, Amersham 社) および 12 単位の T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社) を含む溶液 50  $\mu$ l 中で 37°C 60 分間反応させることによりその 5' 端をリン酸化標識した。上記のフィルターをブレイブリダイゼーション溶液 [5 $\times$ デンハルト溶液 (100 $\times$ デンハルト溶液 = 2% 血清アルブミン、2% フェイコル 400 および 2% ポリビニルピロリドン)、1M NaCl、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM EDTA (pH 8.0)、0.1% デデシルサルコシ酸ナトリウム および 20  $\mu$ g/ml の超音波処理したサケ精子DNA] に 37°C 1 時間浸したあと、ハイブリダイゼーション溶液 (ブレイブリダイゼーション溶液に約 10<sup>6</sup> cpm/ml の上記標

12

識DNAを含む溶液) 中に 37°C 15 時間浸した。このフィルターを 2 $\times$ SSC 溶液を用いて室温で洗浄し、さらに 2 $\times$ SSC、0.1% デデシルサルコシ酸ナトリウム溶液で 42°C 30 分間洗浄した後 X 線フィルム (XAR-5, Kodak 社) に -80°C で一晚露光させた。フィルムの現象の結果、1 次スクリーニングで 8 つの陽性シグナルを得た。これらのシグナルに対応する位置にあるファージを上記プレートからゲル切片として切り取り 1ml の SSM 緩衝液 [100mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM Tris-HCl (pH 7.5) および 0.01% ゼラチン] に浸し、4°C で一晚静置することにより、ゲル中のファージを溶液中に回収した。このようにして得られた 8 種の 1 次スクリーニング陽性ファージについて、それぞれ 1 次スクリーニングと同様の条件で 2 次スクリーニングを行った結果 1 つのみが陽性クローンとして残った。このクローンについてさらに 3 次スクリーニングを行い完全に単一の陽性クローンとして分離した。

【0054】得られた陽性クローンのファージDNA を Leder らの方法 [Leder, P., Teneir, D. & Enquist, L. (1977) Science 196, 175] により調製した。得られたファージDNA の 1/5 量溶液 [100mM Tris-HCl (pH 7.5)、100mM NaCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 6mM メルカプトエタノール、0.1% ゼラチン、20  $\mu$ g/ml リボスクリンナーゼ A および 20 単位の EcoRI (ニッポンジーン社)] 50  $\mu$ l 中で 37°C 1 時間消化後、0.8% アガロースゲルで電気泳動を行った結果、この陽性クローンが約 150 bp のインサートDNA を含むことが分かった。グラスバウダー (Gene Clean<sup>®</sup>, Bio-101 社) を用いてインサートDNA を分離・精製した。回収したDNA 断片約 20ng と EcoRI で消化した pUC19 ベクター約 100 ng とを DNA ライゲーションキット (宝酒造社) A 液 20  $\mu$ l、B 液 4  $\mu$ l の混合液中で 16°C 15 時間反応させることにより両DNA を連結した。得られた組換えプラスミドを得た。この反応液 10  $\mu$ l を用いて Mandel 法 [Mandel, M. & Eliga, A. (1970) J. Mol. Biol. 53, 154] により大腸菌 T G 1 株を形質転換した。得られた形質転換体を 25  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 培地 100ml で 37°C 一晚培養し、アルカリ溶菌法 [Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 1513] によりプラスミドDNA を精製した。このプラスミドDNA 10  $\mu$ g を溶液 [100mM Tris-HCl (pH 7.5)、100mM NaCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 6mM メルカプトエタノール、0.1% ゼラチン および 100 単位の EcoRI (ニッポンジーン社)] 200  $\mu$ l 中で 37°C 1 時間消化後、フェノール抽出、エタノール沈澱を行い濃縮し、0.8% アガロースゲル電気泳動を行った。約 150bp のインサートDNA をグラスバウダーで回収し、以下に記すPDI cDNA のスクリーニングに用いるプローブとした。

【0055】ヒトPDI cDNA の全長を含むクローンを得るために、改めてヒト肝臓g11cDNAライブラリー (Clontech 社) 約 50,000 クローン および ヒト胎盤g11cDNA ラ



13

イブラリー (同社) 約50,000 クローンについてのスクリーニングを行った。上記の順序と同様に両ライブラリーのファージDNAを固定したフィルターを制作した。上記150bp ヒトPDI cDNA断片約100 ngを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (400Ci/nmol, Amersham 社) およびニックトランスレーションキット (同社) を用いて放射性標識したものを本スクリーニングに用いた。上記の両フィルターをプレハイブリダイゼーション溶液に60℃ 1時間浸した後、ハイブリダイゼーション溶液 (プレハイブリダイゼーション溶液に約 $10^6$  cpm/mlの上記標識DNAを含む溶液) 中に60℃ 15時間浸した。このフィルターを2×SSC溶液を用いて室温で洗浄し、さらに0.5×SSC、0.1%ドデシルサルコシ酸ナトリウム溶液で65℃ 1時間洗浄した後X線フィルム (XAR-5, Kodak社) に-80℃で一晩露光させた。フィルムの現像の結果、肝臓 cDNAライブラリーより6個、胎盤 cDNAライブラリーより5個の陽性シグナルを得た。これらをさらに2次、3次のスクリーニングにかけることにより最終的に肝臓 cDNAライブラリーより4個、胎盤 cDNAライブラリーより3個の陽性クローンを単離した。得られた7つのクローンの EcoRIインサートDNA断片を前述と同様の方法に従ってプラスミドベクターpUC19のEcoRI部位にサブクローン化した後、7クローンのインサートについての制限酵素地図を作成した。その結果、肝臓 cDNAの4つおよび胎盤 cDNAの2つが互いにオーバーラップしており、かつ、そのうちの肝臓由来のクローン1つ (pEPD116) と胎盤由来のクローン1つ (pEPD14) の2つが目的とするヒトPDI cDNAの全長をカバーしていることが、これらのクローンとPihlajaniemiらのクローンの制限酵素地図の比較から予想された。両クローンについて M13 SEQUENCING KIT (東洋紡績社)、M13 Sequencing Kit (宝酒造社) および自動DNAシークエンサー (370A, Applied Biosystems社) によりPDI cDNA塩基配列を決定した。Pihlajaniemiらのデータとの比較により両クローンは全長245塩基対から成るヒトPDI cDNAをコードすることが明らかとなった (配列番号1)。

#### 【0056】ヒトPDIの酵母発現プラスミドの構築

上記のヒトPDI cDNAをコードする2つのクローンpEPD116 およびpEPD14をもとにしてヒトPDIの酵母における発現用プラスミドを以下の手順で構築した (第1図 A、BおよびC)。

【0057】アルカリ溶菌法により調製したpEPD116 DNA 約1  $\mu$ gを溶液 [10mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 6mMメルカプトエタノール、0.1%ゼラチン、10単位のEcoRI (ニッポンジーン社) および10単位のPstI (同社) ] 20  $\mu$ l 中で37℃ 1時間消化後、0.8%アガロースゲルで電気泳動を行い、PDI cDNAの5'端側EcoRIからPstI部分の約490bpの長さのDNA断片をガラスバグダーにより分離・精製した。一方 pEPD14 DNA 約1  $\mu$ gを溶液 [10mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 6

14

mM MgCl<sub>2</sub>, 6mMメルカプトエタノール、0.1%ゼラチン、10単位のPstI (ニッポンジーン社) および10単位のBanII (同社) ] 20  $\mu$ l 中で37℃ 1時間消化後同様にPDI cDNAの3' 端側PstIからBanII部分の約1.3kbの長さのDNA断片を分離・精製した。このようにして回収した両DNA断片それぞれ約50ngおよびEcoRIおよびBanIIで消化し、線状にしたプラスミドベクターpUC19 DNA約20ngを宝酒造社のDNAライゲーションキットA液25  $\mu$ l およびB液5  $\mu$ l 中で16℃ 15時間反応させることにより連結させた。この反応液10  $\mu$ l を用いてカラムシウム法により大腸菌MV1190株コンピテントセルを形質転換した。大腸菌は、直径90mmのX-Gal プレート (50  $\mu$ g/ml 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド、80  $\mu$ g/mlイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド、25  $\mu$ g/mlアンピシリン、1.8%培地および1.5%寒天) にまいた。37℃で一晩培養後、得られた白色コロニーを拾い、アルカリ溶菌法でプラスミドDNAを調製し、制限酵素を用いた解析を行い目的とするプラスミドを保持する形質転換体を選択した。得られたプラスミドをpHPD1Eと名付けた。

【0058】pHPD1Eをもとにして、Kunkel法 [Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488] により、cDNA上のPDIシグナル配列とPDIの本体との境界部分に制限酵素NaeI切断部位を導入した。pHPD1E DNAを用いてカルシウム法により大腸菌BW313株コンピテントセルを形質転換した。得られた形質転換体の単コロニーを150  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む2×YT培地 (1.6%バクトトリプトン、0.5% NaCl および1%バクトイーストエキストラクト) で37℃一晩前培養を行った。この培養液1mlを150  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む2×YT培地50mlに接種し37℃でさらに培養した。濁度 (OD<sub>600</sub>) が0.3程度に達したところでM13K07ファージをn.o.i. = 2程度で加え37℃ 30分間静置し感染させた。これに70  $\mu$ g/mlの濃度になるようにカナマイシンを加え37℃ 20時間振盪培養を行った。培養液を遠心分離にかけ得られた上清に1/5容の2.5M NaCl、20%ポリエチレングリコール #6000溶液を加え攪拌した後室温で15分間静置した。遠心分離にかけ得られた沈殿を5mlのTE緩衝液 [10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH8.0)] に溶かし等容の中和フェノールを加え攪拌後遠心分離にかけ水層を回収した。これに等容のクロロホルムを加え攪拌後遠心分離にかけ水層を回収した。得られた溶液に1/10容の3M酢酸ナトリウムおよび2.5容のエタノールを加え攪拌後-80℃で30分間静置し遠心分離によりDNAを沈殿として回収した。これを70%エタノールで洗浄し減圧乾燥後100  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。以上の方法で調製したdUを含むpHPD1E由来の一価DNAを用いて以下の手順で目的とする変異株即ちNaeI部位の導入を行った。変異導入用合成オリゴヌクレオチド (5'-CGGGGGCGCGCGCGCG-3', 宝酒造社) ] 10pmolを溶液 [10



17

リンを含むLBプレート上にまき37℃一晚保温した。得られたコロニーについて、それらの保持するプラスミドDNAの塩基配列解析を行うことにより目的とする組換えプラスミドをもつ形質転換体を選択した。このプラスミドをpUC119Sと名付けた。

【0063】上記の手順で作製したプラスミドpUC119S DNAをアルカリ溶菌法で調製した。このDNA2μgを溶液[10mM Tris-HCl(pH8.0), 100mM NaCl, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 8単位のS101(ニッポンジーン社)および10単位のHind III(宝酒造社)]中で37℃4時間消化後0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約3.2kbの長さのDNA断片をグラスパウダーで分離・精製した。このようにして得られたpHDI19A由来の1.7kb DNA断片約50ngとpUC119 S101由来の3.2kb DNA断片約50ngを宝酒造社ライゲーションキットA液30μl、B液6μl中で16℃30分間反応後、10μlを用いてカルシウム法により大腸菌株JB101コンピテントセル(宝酒造社)を形質転換し、50μl/μlのアンピシリンを含むLBプレートにまいた。このプレートで37℃一晚培養することにより得られたコロニーについて、アルカリ溶菌法を用いてプラスミドDNAを調製し、制限酵素を用いた解析を行うことにより、ヒト血清アルブミンのプロモーター領域にヒトPDI本体を接続した形の(第2図)組換えプラスミドを選択し取得した。このプラスミドをpHDI19と名付けた。

【0064】以上のようにして得られたリーダー配列改良型PDIを酵母アルコールデヒドロゲナーゼI遺伝子のプロモーター支配下で発現させるべく、以下の手順によりヒトPDI発現プラスミドを構築した。アルカリ溶菌法により調製した上記pHDI19 DNA 7μlを溶液[100mM Tris-HCl(pH8.0), 100mM NaCl, 7mM MgCl<sub>2</sub>および40単位のEcoRI(ニッポンジーン社)]100μl中で37℃2時間消化後、等容のフェノール/クロロホルム混液(飽和フェノールとクロロホルムを等容混合した溶液)を加え攪拌し、遠心分離後水層を回収した。このフェノール/クロロホルム抽出を繰返し、得られた水層に1/10容の3M酢酸ナトリウム(pH5.3)および2.5容のエタノールを加え混合し、-40℃2時間静置した。遠心より得られた沈殿を70%エタノールで洗浄後減圧乾燥し50μlのKlenow緩衝液(Kleno-Sequence用Deletion Kit, 宝酒造社)に溶解し、4単位のKlenow fragment緩衝液(宝酒造社)を加え37℃45分間反応させることによりEcoRI切断部分の平滑化を行った。この溶液について2回のフェノール/クロロホルム抽出を行ない、得られた水層に1/10容の3M酢酸ナトリウム(pH5.3)および2.5容のエタノールを加え混合し、-40℃1時間静置した。遠心により得られた沈殿を70%エタノールで洗浄後減圧乾燥し、50μlのKlenow緩衝液(Kleno-Sequence用Deletion Kit, 宝酒造社)に溶解し、4単位のKlenow fragment(宝酒造社)を加え37℃45分間反応させることによりEcoRI切断部分の平滑化を行った。この溶液につ

18

いて2回のフェノール/クロロホルム抽出を行ない、得られた水層に1/10容の3M酢酸ナトリウム(pH5.3)および2.5容のエタノールを加え混合し、-40℃1時間静置した。遠心により得られた沈殿を70%エタノールで洗浄後減圧乾燥し、溶液[10mM Tris-HCl(pH8.0), 60mM NaCl, 7mM MgCl<sub>2</sub>および10単位のBamHI(ニッポンジーン社)]40μlに溶かし37℃3時間反応させた。得られたDNA溶液を0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約1.8kbのDNA断片をグラスパウダーで分離・精製した。一方、アルカリ溶菌法で調製したpJDB-ADH-BSA-A(特開平2-117384号公報)DNA5μlを溶液[10mM Tris-HCl(pH8.0), 100mM NaCl, 7mM MgCl<sub>2</sub>および24単位のXhoI(宝酒造社)]100μl中で37℃2時間消化後、フェノール/クロロホルム抽出を2回行い得られた水層に、1/10容の3M酢酸ナトリウム(pH5.3)および2.5容のエタノールを加え混合し、-40℃2時間静置後遠心により沈殿としてDNAを回収した。このDNA沈殿を70%エタノールで洗浄後減圧乾燥し、50μlのKlenow緩衝液(Kleno-Sequence Deletion Kit, 宝酒造社)に溶解し、4単位のKlenow fragment(宝酒造社)を加え37℃45分間反応させることによりXhoI切断部分の平滑化を行った。この溶液について2回のフェノール/クロロホルム抽出を行ない、得られた水層に1/10容の3M酢酸ナトリウム(pH5.3)および2.5容のエタノールを加え混合し、-40℃1時間静置後、遠心により沈殿としてDNAを回収した。得られたDNAを70%エタノールで洗浄後減圧乾燥し、溶液[10mM Tris-HCl(pH8.0), 60mM NaCl, 7mM MgCl<sub>2</sub>および10単位のBamHI(ニッポンジーン社)]40μlに溶かし、37℃5分間消化した。この溶液に10μlの2M Tris-HCl(pH8.0)、110μlの滅菌水および1単位の大腸菌C75株由来アルカリフォスファターゼ(宝酒造社)を加え混合し、60℃1時間加温することにより酵素切断部の5'脱リン酸化反応を行った。得られた溶液に1/10容の3M酢酸ナトリウム(pH5.3)および2.5容のエタノールを加え混合し、-40℃1時間静置した。遠心により沈殿としてDNAを回収し減圧乾燥後20μlのTEに溶解し0.8%アガロースゲル電気泳動にかけた。約8kbのDNA断片をグラスパウダーを用いて回収した。以上のようにして得られたpHDI19A由来の1.8kb DNA断片約50ngおよびpJDB-ADH-BSA-A由来の8kb DNA断片約50ngを宝酒造社DNAライゲーションキットA液30μl、B液6μlと混合し、16℃2.5時間反応させDNAを連結させた。得られたDNA溶液10μlを用いてカルシウム法により大腸菌C600株を形質転換し、50μl/μlのアンピシリンを含むLBプレートにまき37℃一晚培養した。得られたコロニーについてアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを調製し、制限酵素解析を行うことにより目的とするアルコールデヒドロゲナーゼIプロモーター下流にリーダー配列改良型PDIを連結したプラスミドを保持する形質転換体を選択した。このようにして構築したPDI発現プラスミドをpA

19

HbPDILy1と名付けた。また、この構築の結果、成熟型PD1のN末端アミノ酸はAspからGlyに改変された。

【0065】一方、ヒトPDI発現実験用のコントロールプラスミドを以下の手順で作製した。アルカリ溶菌法で調製したpJDB-ADH-HSA-A DNA 5μlを溶液[10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 7mM MgCl<sub>2</sub>; 24単位のXhoI (宝酒造社)および29単位のBamHI (フューロンジーン社)] 100μl中で37℃ 2時間消化後、フェノール/クロロホルム抽出を2回行い得られた水層に1/10容の3M酢酸ナトリウム(pH5.3)および2.5容のエタノールを加え混合し、-40℃ 2時間静置後遠心によりDNAを沈澱として回収した。このDNAを70%エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、50μlのKlenow緩衝液(Kleno-Sequence Deletion Kit, 宝酒造社)に溶解し、4単位のKlenow fragment (宝酒造社)を加えて37℃ 45分間反応させることによりXhoIおよびBamHI切断部分の平滑化を行った。この溶液について2回フェノール/クロロホルム抽出を行い得られた水層に1/10容の3M酢酸ナトリウム(pH 5.3)および2.5容のエタノールを加え混合し、-40℃ 1時間静置後遠心により沈澱としてDNAを回収した。これを減圧乾燥後20μlのTEに溶解し、0.8%アガロース電気泳動にかけ、約8kbのDNA断片をガラスパウダーで回収した。得られたDNA断片約50ngを宝酒造社DNAライゲーションキットのA液30μl、B液6μlと混合し、16℃一晚反応させ、自己連結により環状化した。このDNA溶液10μlを用いて大腸菌101株コンテントセル(宝酒造社)をカルシウム法により形質転換し、50μl/mlのアmpiシリンを含むLBプレートにまき37℃一晚培養した。得られたコロニーについてアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを調製し、制限酵素解析を行い、目的とするコントロール用プラスミドを選択取得した。得られたプラスミドをpAdと名付けた。

#### 【0066】ヒトPDIの酵母による発現

上記の手順で構築したヒトPDI発現プラスミドpAdhPDILy1を用いて以下に示す方法でヒトPDIの酵母による発現を行った。

【0067】YPDプレート(2%バクトペプトン、1%イーストエキストラクト、2%ブドウ糖および1.5%寒天)上で培養した酵母AH22株の単コロニーを5mlのYPD培地(2%バクトペプトン、1%イーストエキストラクトおよび2%ブドウ糖)に接種し30℃ 24時間振盪培養した。この前培養液0.9mlを45mlのYPD培地に接種し30℃で振盪培養し、OD<sub>600</sub>(濁度)が約0.5に達したところで低速遠心にかけ沈澱として菌を回収した。得られた菌体を3mlの0.2M LiSCNに懸濁し、そのうちの1mlを遠心にかけ沈澱として菌体を回収した。この菌体に46μlの50%PEG #4000、10μlのLiSCNおよびアルカリ溶菌法で調製したpAdhPDILy1 DNA溶液10μl(DNA27μl分)を加えベッティングにより混合し、30℃で一晚静置した。これに1mlの滅菌水を加え懸濁後遠心により菌体を沈澱

20

として回収した。この菌体を100μlの滅菌水で懸濁し、SD(-Leu)プレート[SD(-Leu)培地(0.67%バクトニトロゲンベース、2%ブドウ糖、20mg/lのアデニン、同ウラシル、同トリプトファン、同ヒスチジン、同アルギニン、同メチオニン、30mg/lのチロシン、同イソロイシン、同リジン、50mg/lのフェニルアラニン、100mg/lのアスパラギン酸、同グルタミン酸、150mg/lのバリン、200mg/lのシロネオニンおよび375mg/lのセリン(以上のアミノ酸は和光純薬製))および1.5%寒天]上にまき、30℃で培養した。培養5日目には得られた形質転換体を5mlのSD(-Leu)培地に接種し30℃ 2日間振盪培養した。この前培養液100μlを5mlのYPD培地に接種し30℃ 24時間振盪培養した。得られた培養液1.5mlを遠心分離にかけ上清500μlを回収し、これに等容のエタノールを加え混合後水中に1時間静置した。これを遠心分離にかけ培地中の酵母細胞からの分泌物を沈澱として回収し減圧乾燥した。得られた沈澱を10μlのSDS-PAGE用サンプル緩衝液(125mM Tris-HCl(pH8.8)、4%SDS、20%グリセリン、10%β-メルカプトエタノールおよび0.01%プロモフェノールブルー)に溶解し、5分間煮沸後SDS-PAGEプレート10/20(第一化学薬品)にて電気泳動を行った。このゲルを染色液(0.15%クマシーブリリアントブルー、10%酢酸および40%メタノール)で染色後、脱色液(10%酢酸および40%メタノール)に浸し、発現物を視覚化した。この際コントロールとして上記pAdHを出発点として上述のpAdhPDILy1についてと全く同様の操作により得られた培地サンプルを同時に泳動した。分子量標準としてフォスフォーラゼB(分子量94,000)、ウシ血清アルブミン(67,000)、オボアルブミン(43,000)、カーボクニクタンヒドラーゼ(30,000)、大豆トリプシンインヒビター(20,000)およびα-ラクトアルブミン(14,000)を用いた(第3図)。その結果、分子量約55Kの発現物を見出すことができた。この分子量は、成熟PDIの分子量と一致しており目的とするヒトPDIが発現分泌したものと考えられた。そこで発現分泌物のタンパク質化学的特性を調べることが目的として以下の手順で大量培養を行った。

【0068】pAdhPDILy1を保持する酵母AH22株の単コロニーを80mlのSD(-Leu)培地に接種し、30℃ 2日間振盪培養した。得られた前培養液を80mlずつ41のYPD-リン酸培地(YPD培地、6g/lのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>および3g/lのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 7.0)に接種し、30℃ 24時間振盪培養を行った。この培養液を遠心分離にかけ上清を回収し以下の分泌発現物の精製に用いた。

#### 【0069】

##### 培地からの粗換えヒトPDIの単離とその特性化

上記のようにして得られた形質転換酵母培養液4lを、ミリポア-ミラン限外濾過器(排除分子量30,000)を用い、40倍濃縮を行った(100ml)後、TSK-gel Phenyl-5PW疎水性カラムにより、ヒトPDIを単離した。

21

疎水性カラムは0.85M硫酸、0.05% NaHsを含む10mMホウ酸-10mM KCl緩衝液pH 8.0で平衡化したものから、125分間で、硫酸を含まない同緩衝液へと直線的濃度勾配を形成させることによって溶出した。この時の流速は2 ml/minである。この結果を第4図に示す。第5図には、単離されたヒトPDIのSDS電気泳動図を示す。図に示されるように、疎水性カラムクロマトグラフィーによってヒトPDIはほぼ単一の成分にまで分離され、かつ、PDI活性を保持していることが明らかになった。YPD培地に由来する葉外部吸収物質は、このクロマトグラフィーによってきわめて効率よく除去できることが分かる。

#### [0070] PDI活性の測定

PDI活性の測定は、還元・変性・再酸化による方法で作製したスクランブルドRナゼA(RNase A)の再構成への促進効果を見ることによって行った。リボヌクレアーゼAの再構成の程度は、その酵素活性の回復の程度を指標として定量化した。具体的方法を以下に示す。

[0071] スクランブルドRNase Aの調製: 120mgのRNase Aを6M Guanidinium 塩酸、0.15M ジチオスレイトールを含む3mlの0.1M トリス塩酸緩衝液pH8.6に溶解した後、窒素気流下で、15時間室温で還元を行った。還元物を0.01N HClで平衡化させたセファデックスG-25カラム(15mmφ×38cm)で還元剤を除去した。この脱塩物にGuanidinium 塩酸を最終濃度6Mとなるように加え、更にトリスを加えpHを9.0に合せ、S-S結合の交換反応を暗所、4℃で14日間行なわせた。この試料を-80℃で保存したものをスクランブルドRNase Aとして使用した。

[0072] PDI活性の測定: 窒素置換を施した55mM リン酸緩衝液(pH 7.5) 20mlに、10μlの1M ジチオスレイトールを加えたものを調製し、この溶液から10μlを取り、20μlの酵素試料とまぜた55mM リン酸緩衝液(pH 7.5) 420μlに加え30℃で5分半放置する。これに上記スクランブルドRNase A溶液50μlを加え30℃、15分半反応させる。ここで、1.945mlの脱気した50mM トリス塩酸、5mM 塩化マグネシウム、25mM 塩化カルウムを含む緩衝液pH7.5に、50μlのイーストRNA溶液(10mM トリス塩酸緩衝液pH7.5/1mM EDTA、280nmの吸光度80になるように調製したもの)を1cm角石英セルに加え、攪拌しながら温度を45℃になるように平衡化させる。このとき260nmでの吸光度が変化しないことを確認しておく。ジチオスレイトール処理したスクランブルドRNase A溶液から5μl取り、これをセル中の溶液とまぜながら、0.2分毎に2分間260nmでの吸光度を測る。PDI活性は260nmでの吸光度変化速度の初速から求められる。

#### [0073] ヒトPDI発現プラスミドpAHPDILy1による酵母HIS23株の形質転換

ヒトPDI発現プラスミドpAHPDILy1を用いて、以下の手順に従いHSA生産酵母HIS23株[特開平2-57

885号/微工研研奇第11351号(FERM P-1138)]を形質転換した。

[0074] YPDプレート(2%バクトトリプトン、1%バクトイーストエキストラクト、2%ブドウ糖および1.5%寒天)上で培養したHSA発現酵母HIS23株の単一コロニーを5mlのYPD培地(2%バクトトリプトン、1%イーストエキストラクトおよび2%ブドウ糖)に接種し、30℃で24時間振盪培養した。この培養液1mlを50mlのYPD培地に接種後30℃で振盪培養し、OD<sub>600</sub>(高度)が0.5程度に達したところで菌体を低速遠心により沈殿として回収した。集めた菌体に46μlの50%ポリエチレングリコール#4000、10μlのLISCNおよびアルカリ溶菌液[Birboin, H. C. & Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* 7, 1513.]で調製したヒトPDI発現プラスミドpAHPDILy1 DNA溶液10μl(DNA約20μg)を加えビペーティングにより混合し、30℃で一晩静置した。これに1mlの滅菌水を加え懸濁後、遠心分離により菌体を沈殿として回収した。この菌体を100μlの滅菌水で懸濁し、SD(-His, -Leu)プレート(SD(-His, -Leu)培地(0.67%バクトトリプトン、2%ブドウ糖、20mg/lのブドウ糖、同ウラシル、同トリプトファン、同アラギニン、同メチオニン、30mg/lのチロシン、同イソロシン、同フェニル、50mg/lのフェニルアラニン、100mg/lのアスパラギン酸、同グルタミン酸、150mg/lのバリン、200mg/lのトレオニンおよび375mg/lのセリン(以上のアミノ酸は和光純薬株式会社製))および1.5%寒天)にまき30℃で培養した。培養5日目までプレート上にコロニーとして形質転換体を得た。

[0075] 得られた形質転換体(pAHPDILy1/HIS23)について以下の手順によりPDIの発現を調べた。この際コントロール実験として、pAHPDILy1からPDI cDNA部分を除いたコントロールプラスミドpAHを用いて得られた形質転換体(pAH/HIS23)を以下使用した。プレート上のコロニーを5mlのSD(-His, -Leu)培地に接種し30℃で2日間振盪培養した。この前培養液100μlを5mlのYPD培地に接種後30℃で24時間振盪培養し、得られた培養液1.5mlを遠心分離にかけその上清500μlを回収し、これに等容のエタノールを加え混合後氷中で1時間静置した。これを遠心分離にかけ培地中の酵母からの発現分泌物を沈殿として回収し遠心エバポレーターにより乾燥させた。得られた沈殿を10μlのSDS-PAGE用サンプル緩衝液[62.5mM Tris-HCl(pH6.8)、2% SDS、5% β-メルカプトエタノール、0.005% ブロモフェノールブルーおよび20%グリセリン]に溶解し、5分間煮沸後SDS-PAGEプレート4/20-1010(第一化学薬品株式会社製)で電気泳動を行った。泳動後のゲルを染色液(0.15%クマシーブリリアントブルー、10%酢酸および40%メタ

23

ノール)で染色後、脱色液(10%酢酸および40%メタノール)に浸し培地中の発現分泌物を視覚化した。この際、分子量標準としてフォスホリラーゼb(分子量94,000ダルトン)、ウシ血清アルブミン(67,000)、オボアルブミン(43,000)、カーボニックアンヒドラーゼ(30,000)、大豆トリプシンインヒビター(20,000)および $\alpha$ -ラクトアルブミン(14,000)を用いた(第6図)。その結果、pAHhPDILy1によって形質転換した酵母HIS23株で、分子量約55,000ダルトンのPDIの発現分泌が検出された。

【0076】ヒトPDIのHSA発現分泌に対する効果  
上記の酵母におけるHSAおよびPDIの共発現系を用いて、ヒトPDIのHSA発現分泌に対する効果を以下の手順によって調べた。

【0077】コントロールプラスミドpAHおよびヒトPDI発現プラスミドpAHhPDILy1それぞれによって形質転換した酵母HIS23株、即ちpAH/HIS23株およびpAHhPDILy1/HIS23株の独立したコロニー5つづつを各々5mlのSD(-His, -Leu)培地に接種し30℃で24時間前培養を行った。この前培養液100 $\mu$ lをそれぞれ5mlのYPD培地に接種し30℃で24時間振盪培養を行ない、各培養液から前項で述べた方法によりSDS-PAGE用の試料を調製しSDS-PAGEを行なった(第7図)。得られたゲルを用いて、各株のHSA分泌量をデンストメーター(IMAGE ANALYSIS SYSTEM、テフコ株式会社製)で定量化し、PDIの共発現によるHSAの発現分泌量の変化を調べた(第8図)。その結果、pAH/HIS23株で平均0.93mg/

24

l またpAHhPDILy1/HIS23株で同じく1.50mg/lのHSAを分泌しており、酵母HIS23株におけるヒトPDIの共発現により、HSAの分泌量は平均で約60%の増加を示した。

【0078】

【発明の効果】本発明は、ヒト血清アルブミンプレプロ配列をコードするDNAとヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子とから成る連結遺伝子を用いることにより、ヒトPDIの大量生産法の手段を初めて確立したものである。これにより、この方法は、S-S結合の掛け違い等の理由で高次構造形成が不完全な蛋白質の活性化を促進するために大量かつ安価な手段として用いることができる。主に遺伝子工学的に産生された不活性蛋白質の活性化に効果的であると考えられ、この酵素の発現を他の有用ポリペプチドの発現と共役させることにより、その有用ポリペプチドの宿主細胞による産生効率を上昇させることが可能となった。その他、研究用試薬としても使用できる。

【0079】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2454

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源: ヒト肝臓又は胎盤入gt 11 cDNAライブラリー (Clontech社)

配列

```

GAATTCGGG GGGACGAGA GAAGCGCCC GCTGATCCG TGTCCGAC ATG CTG CGC      57
                                         Met Leu Arg
                                         -15
GCG CGT CTG CTG TGC CTG GCC GTG GCC CTG GTG CGC GCC GAC GCC      105
Arg Ala Leu Leu Cys Leu Ala Val Ala Ala Leu Val Arg Ala Asp Ala
                                         -10          -5          1
CCC GAG GAG GAG GAC CAC GTC CTG GTG CTG CGG AAA AGC AAC TTC GCG      153
Pro Glu Glu Glu Asp His Val Leu Val Leu Arg Lys Ser Asp Phe Ala
                                         5          10          15
GAG GCG CTG GCG GCC CAC AAG TAC CTG CTG GTG GAG TTC TAT GCC CCT      201
Glu Ala Leu Ala Ala His Lys Tyr Leu Leu Val Glu Phe Tyr Ala Pro
                                         20          25          30
TGG TGT GGC CAC TGC AAG GCT CTG GCC CCT GAG TAT GGC AAA GCC GCT      249
Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Lys Ala Ala
                                         35          40          45          50
GGG AAG CTG AAG GCA GAA GGT TCC GAG ATC AGG TTG GCC AAG GTG GAC      297
Gly Lys Leu Lys Ala Glu Gly Ser Glu Ile Arg Leu Ala Lys Val Asp
                                         55          60          65
GCC ACG GAG GAG TCT GAC CTG GCC CAG CAG TAC GGC GTG CGC GGC TAT      345
Ala Thr Glu Glu Ser Asp Leu Ala Glu Gln Tyr Gly Val Arg Gly Tyr
                                         70          75          80

```

25	62
CCC ACC ATC AAG TTC TTC AGG AAT GGA GAC ACG GCT TCC CCC AAG GAA	393
Pro Thr Ile Lys Phe Phe Arg Asn Gly Asp Thr Ala Ser Pro Lys Glu	
85 90 95	
TAT ACA GCT GGC AGA GAG GCT GAT GAC ATC GTG AAC TGG CTG AAG AAG	441
Tyr Thr Ala Gly Arg Glu Ala Asp Asp Ile Val Asn Trp Leu Lys Lys	
100 105 110	
CGC ACG GGC CCG GCT GCC ACC ACC CTG CCT GAC GGC GCA GCT GCA GAG	489
Arg Thr Gly Pro Ala Ala Thr Thr Leu Pro Asp Gly Ala Ala Ala Glu	
115 120 125 130	
TCC TTG GTG GAG TCC ACG GAG GTG GCT GTC ATC GGC TTC TTC AAG GAC	537
Ser Leu Val Glu Ser Ser Glu Val Ala Val Ile Gly Phe Phe Lys Asp	
135 140 145	
GTG GAG TCG GAC TCT GCC AAG CAG TTT TTG CAG GCA GCA GAG GCC ATC	585
Val Glu Ser Asp Ser Ala Lys Gln Phe Leu Gln Ala Ala Glu Ala Ile	
150 155 160	
GAT GAC ATA CCA TTT GGG ATC ACT TCC AAC AGT GAC GTG TTC TCC AAA	633
Asp Asp Ile Pro Phe Gly Ile Thr Ser Asn Ser Asp Val Phe Ser Lys	
165 170 175	
TAC CAG CTC GAC AAA GAT GGG GTT GTC CTC TTT AAG AAG TTT GAT GAA	681
Tyr Gln Leu Asp Lys Asp Gly Val Val Leu Phe Lys Lys Phe Asp Glu	
180 185 190	
GGC CGG AAC AAC TTT GAA GGG GAG GTC ACC AAG GAG AAC CTG CTG GAC	729
Gly Arg Asn Asn Phe Glu Gly Glu Val Thr Lys Glu Asn Leu Leu Asp	
195 200 205 210	
TTT ATC AAA CAC AAC CAG CTG CCC CTT GTC ATC GAG TTC ACC GAG CAG	777
Phe Ile Lys His Asn Gln Leu Pro Leu Val Ile Glu Phe Thr Glu Gln	
215 220 225	
ACA GCC CCG AAG ATT TTT GGA GGT GAA ATC AAG ACT CAC ATC CTG CTG	825
Thr Ala Pro Lys Ile Phe Gly Gly Glu Ile Lys Thr His Ile Leu Leu	
230 235 240	
TTC TTG CCC AAG AGT GTG TCT GAC TAT GAC GGC AAA CTG AGC AAC TTC	873
Phe Leu Pro Lys Ser Val Ser Asp Tyr Asp Gly Lys Leu Ser Asn Phe	
245 250 255	
AAA ACA GCA GCC GAG AGC TTC AAG GGC AAG ATC CTG TTC ATC TTC ATC	921
Lys Thr Ala Ala Glu Ser Phe Lys Gly Lys Ile Leu Phe Ile Phe Ile	
260 265 270	
GAC AGC GAC CAC ACC GAC AAC CAG CGC ATC CTC GAG TTC TTT GGC CTG	969
Asp Ser Asp His Thr Asp Asn Gln Arg Ile Leu Glu Phe Phe Gly Leu	
275 280 285 290	
AAG AAG GAA GAG TGC CCG GCC GTG CGC CTC ATC ACC CTG GAG GAG GAG	1017
Lys Lys Glu Glu Cys Pro Ala Val Arg Leu Ile Thr Leu Glu Glu Glu	
295 300 305	
ATG ACC AAG TAC AAG CCC GAA TCG GAG GAG CTG ACG GCA AGG AGC ATC	1065
Met Thr Lys Tyr Lys Pro Glu Ser Glu Glu Leu Thr Ala Glu Arg Ile	
310 315 320	
ACA GAG TTC TGC CAC CGC TTC CTG GAG GGC AAA ATC AAG CCC CAC CTG	1113
Thr Glu Phe Cys His Arg Phe Leu Glu Gly Lys Ile Lys Pro His Leu	
325 330 335	
ATG AGC CAG GAG CTG CCG GAG GAC TGG GAC AAG CAG CCT GTC AAG GTG	1161
Met Ser Gln Glu Leu Pro Glu Asp Trp Asp Lys Gln Pro Val Lys Val	

27	28
340	345
CIT GTT GGG AAG AAC TTT GAA GAC GTG GCT TTT GAT GAG AAA AAA AAC	1209
Leu Val Gly Lys Asn Phe Glu Asp Val Ala Phe Asp Glu Lys Lys Asn	
355	360
GTC TTT GTG GAG TTC TAT GCC CCA TGG TGT GGT CAC TGC AAA CAG TTG	1257
Val Phe Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Glu Leu	
375	380
GCT CCC ATT TGG GAT AAA CTG GGA GAG ACG TAC AAG GAC CAT GAG AAC	1305
Ala Pro Ile Trp Asp Lys Leu Gly Glu Thr Tyr Lys Asp His Glu Asu	
390	395
ATC GTC ATC GCC AAG ATG GAC TCG ACT GCC AAC GAG GTG GAG GCC GTC	1353
Ile Val Ile Ala Lys Met Asp Ser Thr Ala Asn Glu Val Glu Ala Val	
405	410
AAA GTG CAC AGC TTC CCC ACA CTC AAG TTC TTT CCT GCC AGT GCC GAC	1401
Lys Val His Ser Phe Pro Thr Leu Lys Phe Phe Pro Ala Ser Ala Asp	
420	425
AGG ACG GTC ATT GAT TAC AAC GGG GAA CGC ACG CTG GAT GGT TTT AAG	1449
Arg Thr Val Ile Asp Tyr Asn Gly Glu Arg Thr Leu Asp Gly Phe Lys	
435	440
AAA TTC CTG GAG AGC GGT GGC CAG GAT GGG GCA GGG GAT GAT GAC GAT	1497
Lys Phe Leu Glu Ser Gly Gly Glu Asp Gly Ala Gly Asp Asp Asp Asp	
455	460
CTC GAG GAC CTG GAA GAA GCA GAG GAG CCA GAC ATG GAG GAA GAC GAT	1545
Leu Glu Asp Leu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Asp Met Glu Glu Asp Asp	
470	475
GAT CAG AAA GCT GTG AAA GAT GAA CTG TAA TACGCAAGC CAGACCGGG	1595
Asp Glu Lys Ala Val Lys Asp Glu Leu *	
485	490
CGCTGCGAG ACCCTCGGG GCTGCACAC CCAGCAGCAG CGCAGCGCTC CGAAGCCTGC	1655
GGCTCGCTT GAAGGAGGGC GTGCGCGGAA ACCCAGGGAA CCTCTCTGAA GTGACACCTC	1715
ACCCCTACAC ACCGTCGGTT CACCCCGCTC TCTCTCTCTT GCTTTTCGGT TTTTGGAAAG	1775
GGATCCATCT CCAGGCAGCC CACCTGGTG GGGCTTGTCT CTTGAAACCA TGATGTACTT	1835
TTTCATACAT GAGTCTGTGC AGAGTCTTTC CTACCGTGT CCGAGTCTCG CTGCTCTCCT	1895
CCCGGGGAG GTTCTCTCTC TTTTGTGAAA TTCCGCTCTG GGAATTTTGA GACATTTTTC	1955
GACATCAGGG TATTTGTTC ACCTTGGCCA GGCTCTCTCG GAGAAGCTTG TCCCGCTGT	2015
GGAGGAGAC GAGCCGGACT GGACATGGTC ACTCAGTACC GCCTGCAGTG TCGCATGAC	2075
TGATCATGGC TCTTGCAATT TTGGGTAAT GGAGACTTCC GGATCTGTG AGGGTGTCCC	2135
CCATGCTGGG AAGAGGAGCT GTTGGCTGCC AGCCCTGGGG CCGGCGACAG GCCTGGGCTT	2195
TCCCTCTCCC TCAAGCCAGG GCTCTCTCTC CTGTCGTGGG CTCATTGTGA CCAGTGGACT	2255
CTCTACAGCA CGGCTGTGG CCTGTTCAAG GCAAGACAC GACCCTTGAC TCCCGGCTGG	2315
GGAGTGGGCC AAGGATGCTG GAGCTGAATC AGAAGCTGAC AGTCTTTCAG GCATTCTAT	2375
TTCAAGATCG AATTGAACAC ATTGGCCAAA TAAAGTTGAA ATTTTACCCA CCAAAAAAAA	2435
AAAAAAAA CCGGAATTC	2454

配列番号: 2

配列の長さ: 1545

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (半合成DNA)

配列

ATG AAG TGG GTT ACC TTC ATC TCT TTG TTG 30  
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu

-20

-15



29	30
TTC TTG TTC TCT TCT GCT TAC TCT AGA GGT GTT TTC AGA AGG GGC GCC	78
Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Gly Ala	
-10 -5 1	
CCC GAG GAG GAG GAC CAC GTC CTG GTG CTG CGG AAA AGC AAC TTC GCG	126
Pro Glu Glu Glu Asp His Val Leu Val Leu Arg Lys Ser Asn Phe Ala	
5 10 15	
GAG GCG CTG GCG GCC CAC AAG TAC CTG CTG GTG GAG TTC TAT GCC CCT	174
Glu Ala Leu Ala Ala His Lys Tyr Leu Leu Val Glu Phe Tyr Ala Pro	
20 25 30	
TGG TGT GGC CAC TGC AAG GCT CTG GCC CCT GAG TAT GCC AAA GGC GCT	222
Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Lys Ala Ala	
35 40 45 50	
GGG AAG CTG AAG GCA GAA GGT TOC GAG ATC AGG TTG GCC AAG GTG GAC	270
Gly Lys Leu Lys Ala Glu Gly Ser Glu Ile Arg Leu Ala Lys Val Asp	
55 60 65	
GCC ACG GAG GAG TCT GAC CTG GCC CAG CAG TAC GGC GTG GCG GGC TAT	318
Ala Thr Glu Glu Ser Asp Leu Ala Glu Glu Tyr Gly Val Arg Gly Tyr	
70 75 80	
CCC ACC ATC AAG TTC TTC AGG AAT GGA GAC ACG GCT TOC CCC AAG GAA	366
Pro Thr Ile Lys Phe Phe Arg Asn Gly Asp Thr Ala Ser Pro Lys Glu	
85 90 95	
TAT ACA GCT GGC AGA GAG GCT GAT GAC ATC GTG AAC TGG CTG AAG AAG	414
Tyr Thr Ala Gly Arg Glu Ala Asp Asp Ile Val Asn Trp Leu Lys Lys	
100 105 110	
CGC ACG GGC CCG GCT GGC ACC ACC CTG CCT GAC GGC GCA GCT GCA GAG	462
Arg Thr Gly Pro Ala Ala Thr Leu Pro Asp Gly Ala Ala Ala Glu	
115 120 125 130	
TCC TTG GTG GAG TCC AGC GAG GTG GCT GTC ATC GGC TTC TTC AAG GAC	510
Ser Leu Val Glu Ser Ser Glu Val Ala Val Ile Gly Phe Phe Lys Asp	
135 140 145	
GTG GAG TCG GAC TCT GCC AAG CAG TTT TTG CAG GCA GCA GAG GCC ATC	558
Val Glu Ser Asp Ser Ala Lys Glu Phe Leu Glu Ala Ala Glu Ala Ile	
150 155 160	
GAT GAC ATA CCA TTT GGG ATC ACT TOC AAC AGT GAC GTG TTC TOC AAA	606
Asp Asp Ile Pro Phe Gly Ile Thr Ser Asn Ser Asp Val Phe Ser Lys	
165 170 175	
TAC GAG CTC GAC AAA GAT GGG GTT CTC GTC TTT AAG AAG TTT GAT GAA	654
Tyr Glu Leu Asp Lys Asp Gly Val Val Leu Phe Lys Lys Phe Asp Glu	
180 185 190	
GGC CGG AAC AAC TTT GAA GGG GAG GTC AOC AAG GAG AAC CTG CTG GAC	702
Gly Arg Asn Asn Phe Glu Gly Glu Val Thr Lys Glu Asn Leu Leu Asp	
195 200 205 210	
TTT ATC AAA CAC AAC CAG CTG CCC CTT GTC ATC GAG TTC ACC GAG CAG	750
Phe Ile Lys His Asn Glu Leu Pro Leu Val Ile Glu Phe Thr Glu Glu	
215 220 225	
ACA GCC CCG AAG ATT TTT GGA GGT GAA ATC AAG ACT CAC ATC CTG CTG	798
Thr Ala Pro Lys Ile Phe Gly Gly Glu Ile Lys Thr His Ile Leu Leu	
230 235 240	
TTC TTG CCC AAG AGT GTG TCT GAC TAT GAC GGC AAA CTG AGC AAC TTC	846
Phe Leu Pro Lys Ser Val Ser Asp Try Asp Gly Lys Leu Ser Asn Phe	

31			32
245	250	255	
AAA ACA GCA GCC GAG AGC TTC AAG GGC AAG ATC CTG TTC ATC TTC ATC			894
Lys Thr Ala Ala Glu Ser Phe Lys Gly Lys Ile Leu Phe Ile Phe Ile			
260	265	270	
GAC AGC GAC CAC ACC GAC AAC CAG CGC ATC CTC GAG TTC TTT GGC CTG			942
Asp Ser Asp His Thr Asp Asn Gln Arg Ile Leu Gln Phe Phe Gly Leu			
275	280	285	290
AAG AAG GAA GAG TGC CCG GCC GTG CGC CTC ATC ACC CTG GAG GAG GAG			990
Lys Lys Glu Glu Cys Pro Ala Val Arg Leu Ile Thr Leu Glu Glu Glu			
295	300	305	
ATG ACC AAG TAC AAG CCC GAA TCG GAG GAG CTG ACG GCA GAG AGG ATC			1038
Met Thr Lys Tyr Lys Pro Glu Ser Glu Glu Leu Thr Ala Glu Arg Ile			
310	315	320	
ACA GAG TTC TGC CAC CGC TTC CTG GAG GGC AAA ATC AAG CCC CAC CTG			1086
Thr Glu Phe Cys His Arg Phe Leu Glu Gly Lys Ile Lys Pro His Leu			
325	330	335	
ATG AGC CAG GAG CTG CCG GAG GAC TGG GAC AAG CAG CCT GTC AAG GTG			1134
Met Ser Gln Glu Leu Pro Glu Asp Trp Asp Lys Glu Pro Val Lys Val			
340	345	350	
CTT GTT GGG AAG AAC TTT GAA GAC GTC GCT TTT GAT GAG AAA AAA AAC			1182
Leu Val Gly Lys Asn Phe Glu Asp Val Ala Phe Asp Glu Lys Lys Asn			
355	360	365	370
GTC TTT GTG GAG TTC TAT GCC CCA TGG TGT GGT CAC TGC AAA CAG TTG			1230
Val Phe Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Gln Leu			
375	380	385	
GCT CCC ATT TGG GAT AAA CTG GGA GAG ACG TAC AAG GAC CAT GAG AAC			1278
Ala Pro Ile Trp Asp Lys Leu Gly Glu Thr Tyr Lys Asp His Glu Asn			
390	395	400	
ATC GTC ATC GCC AAG ATG GAC TCG ACT GCC AAC GAG GTG GAG GCC GTC			1326
Ile Val Ile Ala Lys Met Asp Ser Thr Ala Asn Glu Val Glu Ala Val			
405	410	415	
AAA GTG CAC AGC TTC CCC ACA CTC AAG TTC TTT CCT GCC AGT GCC GAC			1374
Lys Val His Ser Phe Pro Thr Leu Lys Phe Phe Pro Ala Ser Ala Asp			
420	425	430	
AGG ACG GTC ATT GAT TAC AAC GGG GAA CGC ACG CTG GAT GGT TTT AAG			1422
Arg Thr Val Ile Asp Tyr Asn Gly Glu Arg Thr Len Asp Gly Phe Lys			
435	440	445	450
AAA TTC CTG GAG ACG GGT GGC CAG GAT GGG GCA GGG GAT GAT GAC GAT			1470
Lys Phe Leu Glu Ser Gly Gly Gln Asp Gly Ala Gly Asp Asp Asp Asp			
455	460	465	
CTC GAG CAG CTG GAA GAA GCA GAG GAG CCA GAC ATG GAG GAA GAC GAT			1518
Leu Glu Asp Leu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Asp Met Glu Glu Asp Asp			
470	475	480	
GAT CAG AAA GCT GTG AAA GAT GAA CTG			1545
Asp Gln Lys Ala Val Lys Asp Glu Leu			
485	490		

配列番号: 3

配列の長さ: 491

配列の型: アミノ酸

配列

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

—708—

35  
 Glu Asn Ile Val Ile Ala Lys Met Asp Ser Thr Ala Asn Glu Val Glu  
 405 410 415  
 Ala Val Lys Val His Ser Phe Pro Thr Leu Lys Phe Phe Pro Ala Ser  
 420 425 430  
 Ala Asp Arg Thr Val Ile Asp Tyr Asn Gly Glu Arg Thr Leu Asp Gly  
 435 440 445  
 Phe Lys Lys Phe Leu Glu Ser Gly Gly Glu Asp Gly Ala Gly Asp Asp  
 450 455 460  
 Asp Asp Leu Glu Asp Leu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Asp Met Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Asp Asp Asp Glu Lys Ala Val Lys Asp Glu Leu  
 485 490

【図面の簡単な説明】

【図1】第1図Aは、発現プラスミド pARhPDILy1 の構築工程図を示す。

【図2】第1図Bは、発現プラスミド pARhPDILy1 の構築工程図を示す。

【図3】第1図Cは、発現プラスミド pARhPDILy1 の構築工程図を示す。

【図4】第2図は、ヒト発現プラスミド上のHSAプロ配列とPDIの境界部を示す図である。

【図5】第3図は、発現・分泌された粗組織換えヒトPDIのSDS電気泳動結果を示す写真であり、ここでレーン1は分子量マーカー、レーン2はpARh/AR22（コントロール）、レーン3は pARhPDILy1/AR22を示す。

【図6】第4図は、疎水性カラムクロマトグラフィーに

よる組織換えヒトPDIの分離を示す図である。

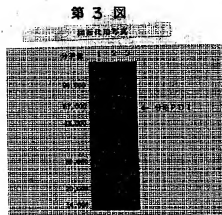
【図7】第5図は、精製組織換えヒトPDIのSDS電気泳動結果を示す図であり、図面中、下側の数字は第4図に示す疎水性カラムクロマトグラフィーの分離番号を、またMは分子量マーカーを示す。

【図8】第6図は、酵母HIS23におけるヒトPDIの発現を示す電気泳動写真である。

【図9】第7図は、酵母HIS23におけるヒトPDIとHSAとの共発現によるHSA分泌を示すSDS電気泳動写真である。

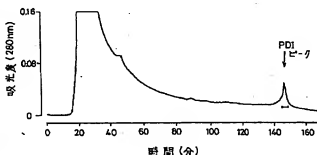
【図10】第8図は、第7図のSDS電気泳動ゲルを用いてHSA分泌量をデンストメーターで定量化した結果を示す図である。

【図5】



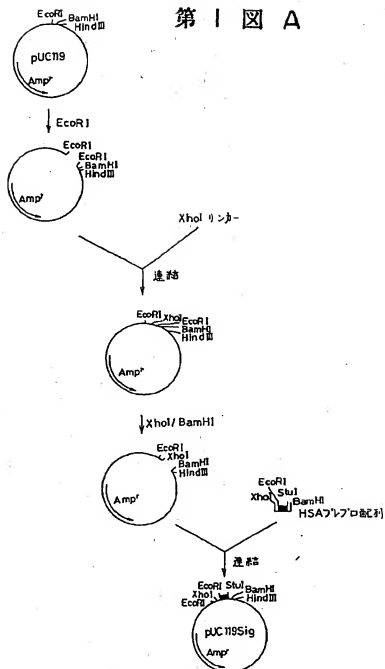
【図6】

第4図



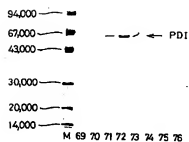
【図1】

## 第1図 A



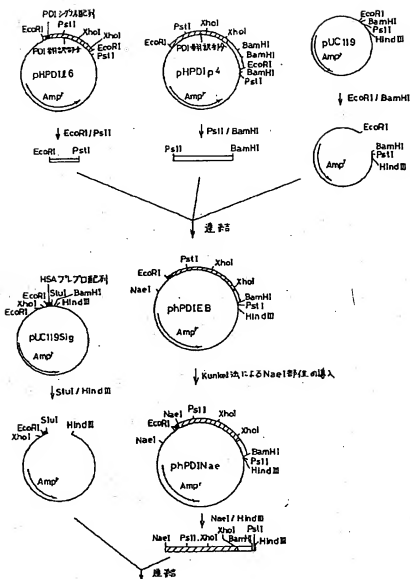
【図7】

## 第5図



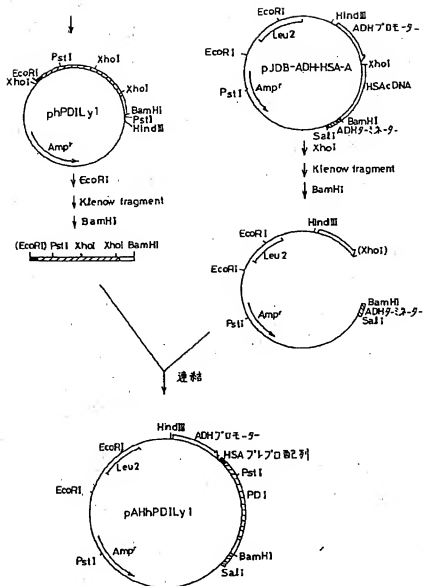
【図2】

## 第1図B



【図3】

## 第1図C



第2図

【圖 4】

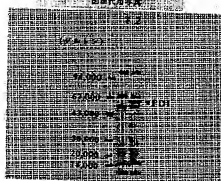
...ATG AAG TGG GTT ACC TAT AIC TGT TTG TTG TTG TCT TCT TCT TCT TAC TCT  
 ...ATG AAG GTT GTT TCT AGA AGG GGC CCC GAG GAG GAG GAG GAC CAC ...  
 ...ATG Lys Thr Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser  
 HSA 777 782 787 PDI 448  
 ...ATG AAG GTT GTT TCT AGA AGG GGC CCC GAG GAG GAG GAG GAC CAC ...

HSAプロテオミクス配列 \_\_\_\_\_ PDI本体



【図8】

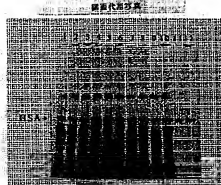
第6図



- 1: pAH/HIS23  
2: pAHhPDILy1/HIS23

【図9】

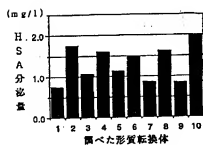
第7図



- 1, 3, 5, 7, 9: pAH/HIS23  
2, 4, 6, 8, 10: pAHhPDILy1/HIS23  
11: HSA標準0.25 $\mu$ g  
12: HSA標準0.5 $\mu$ g

【図10】

第8図



- 1, 3, 5, 7, 9: pAH/HIS23  
2, 4, 6, 8, 10: pAHhPDILy1/HIS23

## 【手続補正書】

【提出日】平成5年3月2日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1A】 第1図Aは、発現プラスミドpAHhPDILy1の構築工程図を示す。

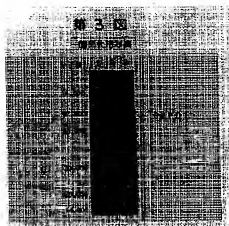
【図1B】 第1図Bは、発現プラスミドpAHhPDILy1の構築工程図を示す。

【図1C】 第1図Cは、発現プラスミドpAHhPDILy1の構築工程図を示す。

【図2】 第2図は、ヒト発現プラスミド上のHSAプロモーターとPDIの境界部を示す図である。

【図3】 第3図は、発現・分泌された粗組織換えヒトPDIのSDS電気泳動結果を示す写真であり、ここでレーン1は分子量マーカー、レーン2はpAH/AH22(コントロール)、レーン3はpAHhPDILy1/A22を示す。 \*

【図3】



\* 【図4】 第4図は、疎水性カラムクロマトグラフィーによる組織換えヒトPDIの分離を示す図である。

【図5】 第5図は、精製組織換えヒトPDIのSDS電気泳動結果を示す図であり、図面中、下側の数字は第4図に示す疎水性カラムクロマトグラフィーの分画番号を、またMは分子量マーカーを示す。

【図6】 第6図は、酵母HIS23におけるヒトPDIの発現を示す電気泳動写真である。

【図7】 第7図は、酵母HIS23におけるヒトPDIとHSAとの共発現によるHSA分泌を示すSDS電気泳動写真である。

【図8】 第8図は、第7図のSDS電気泳動ゲルを用いてHSA分泌量をデンストメーターで定量化した結果を示す図である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

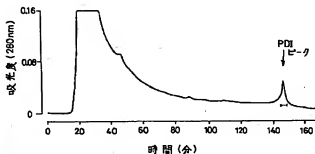
【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

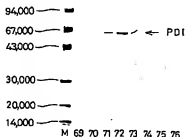
【図4】

第4図

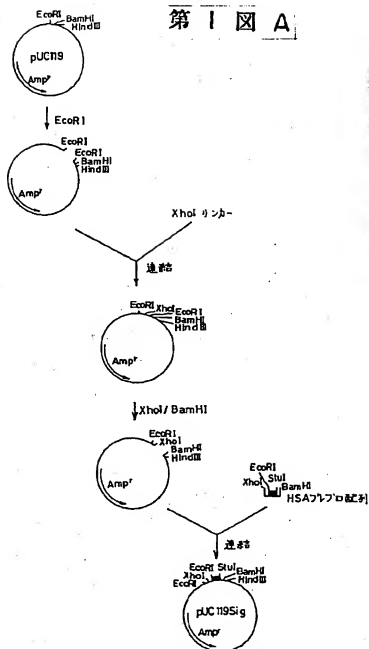


【図5】

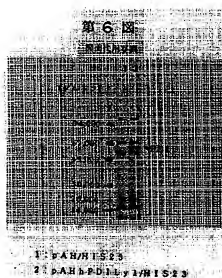
第5図



【図1 A】

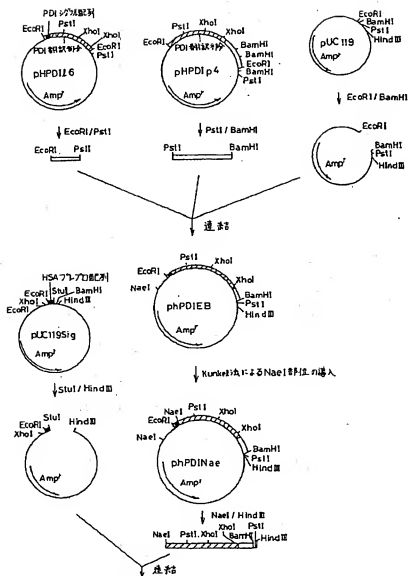


【図6】



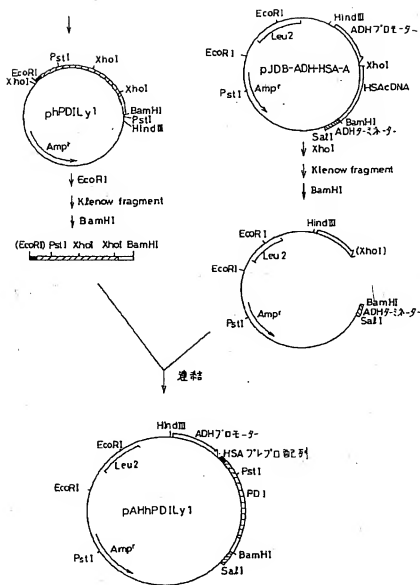
【図1B】

## 第1図B



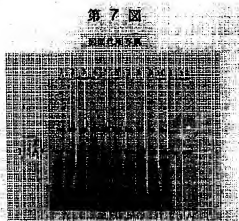
【図1C】

## 第 1 図 C



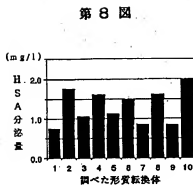


【図7】



1、3、5、7、9: pAH/HIS23  
 2、4、6、8、10: pAHhPDILy1/HIS23  
 11: HSA濃度 0.25 μg  
 12: HSA濃度 0.5 μg

【図8】



1、3、5、7、9: pAH/HIS23  
 2、4、6、8、10: pAHhPDILy1/HIS23

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C12N 15/12

C12P 21/02

// G01N 30/00

(C12N 1/19

C12R 1:865)

(C12N 9/90

C12R 1:865)

(C12P 21/02

C12R 1:865)

識別記号

片内整理番号

FI

技術表示箇所

C 8214-4B

8310-2J

(72)発明者 鈴木 正則

埼玉県入間郡大井町西越ケ岡一丁目3番1

号 東燃株式会社総合研究所内